

综述与专论

真核基因转录激活的多位点协同调控*

薛文 王进** 黄启来 郑伟娟 华子春

(南京大学生命科学学院生物化学系, 医药生物技术国家实验室, 南京 210093)

摘要 真核基因的转录激活具有协同性的特征, 表现为多个转录调控位点的共同作用效果大于每个位点单独作用之和, 受多个位点调控的基因转录呈 S 型曲线. 多个激活蛋白之间的相互作用、激活蛋白与各 DNA 位点的协同结合以及激活蛋白与转录机器的协同作用, 三种途径都对协同性转录激活行为产生影响. 协同性转录激活的本质是多个结合在调控位点上的激活蛋白之间直接或间接的相互作用. 多位点的协同转录调控机制有助于理解生物的多种调控过程和建立基因调控网络.

关键词 转录, 转录激活, 调控, 协同作用

学科分类号 Q75

真核 II 类基因的转录起始阶段, 激活蛋白与基因上游的调控位点结合从而激活基因的转录^[1]. 多数真核基因具有两个或两个以上的转录调控位点. 微小染色体维持蛋白 1 (minichromosome maintenance protein 1, MCM1) 是调控酵母细胞周期、膜蛋白合成等生物过程的一种激活因子, 计算机搜索发现酵母基因组内 67 个基因的上游存在 3 个以上 MCM1 结合位点. 例如磷脂酰肌醇合成酶 PIS1 基因上游 157 bp 到 949 bp 之间存在 3 个 MCM1 结合位点. ZEBRA 是 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 由溶原状态向溶菌状态转变过程中表达的关键蛋白, EBV 基因组内有 15 个基因, 具有 3 个以上 ZEBRA 结合位点, 例如 BHLF1 基

因上游 227 bp 到 1 178 bp 范围内有 8 个 ZEBRA 结合位点. 多个调控位点对基因转录具有协同性的激活作用, 表现为 S 型转录曲线 (合成 mRNA 的量随激活蛋白浓度的变化) 和多个位点的作用效果大于每个位点单独作用之和 (图 1)^[2,3]. 协同性提高了转录激活的效率, 特定条件下激活蛋白浓度的微小变化就可以导致转录合成 mRNA 量的明显变化, 这可以有效地控制基因表达对大量不同环境信号的响应, 使生物调控兼具准确性与灵敏性^[3].

1 多个调控位点的协同激活

结合在基因上游的调控蛋白通过募集 DA 复合物 (DA complex, 由一般转录因子 TF II A、TF II D 组成的复合物) 和全酶 (holoenzyme) 等多种蛋白质因子在 TATA 盒上形成一般转录机器 (general transcriptional machinery)^[1,4] (图 2) 从而激活基因的转录. 真核转录体系的组成较为复杂, 因此有必要建立简化的生物化学实验体系以助于对转录机理的揭示.

Carey 等^[5]在具有 E4 启动子的基因上游构建了不同数量的酵母激活蛋白 GAL4 结合位点, 并使用 GAL4-VP16 融合蛋白激活体外转录. 引物延伸方法检测这些模板上的转录活性发现, 在激活蛋白

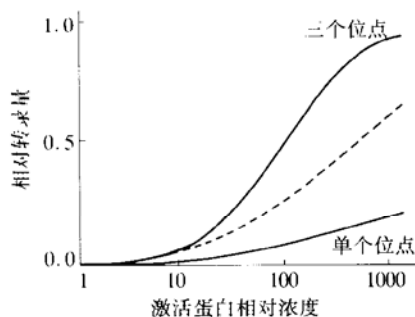


Fig. 1 Transcriptional activation from one and three regulatory sites respectively^[3]

图 1 单个上游调控位点和三个位点对基因转录的激活作用^[3] 单个位点的转录激活效率最低, mRNA 随激活蛋白浓度线性增长, 其 3 倍转录水平用虚线表示; 上方的 S 形曲线表示三个位点上的转录激活, 其作用效果远大于单个位点激活作用的 3 倍.

* 国家自然科学基金资助项目 (39970184, 79970116).

** 通讯联系人.

Tel: 025-3592332, E-mail: jwang@nju.edu.cn

收稿日期: 2001-12-30, 接受日期: 2002-02-08

GAL4-VP16 相同浓度下, 带有 2 个和 5 个结合位点的模板上的转录活性分别是 1 个结合位点模板上的 3.6 倍和 12.5 倍. 在 EBV 病毒的 ZEBRA 调控模型中也发现了类似的结果^[3, 4, 6], Wang 等^[3]系统地研究了不同数量和不同结合能力的 ZEBRA 结合位点对转录的激活作用, 提出了多位点协同作用的理论模型. 根据这一模型, 基因转录的激活水平是激活蛋白浓度、调控位点个数、激活蛋白结合 DNA 位点的亲和力以及转录机器中的特定因子结合启动子的亲和力等多个变量的函数.

不同激活蛋白作用也存在着协同性, Kakidani 等^[7]发现酵母的 GAL4 和小鼠的糖皮质激素受体能够协同地激活具有这两种调控位点的小鼠基因转录. 这样的协同性使有限种类的激活蛋白可以对大量的真核基因在时间和空间上进行精密的调控^[2].

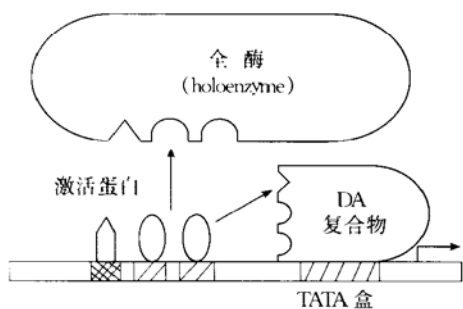


Fig 2 Transcriptional activation of eukaryotic class II gene^[4]

图 2 真核 II 类基因的转录激活模型^[4]

激活蛋白与基因上游的调控位点结合, 并募集 DA 复合物和全酶在 TATA 盒上形成转录机器. 全酶由 RNA 聚合酶 II、一般转录因子 (general transcription factors) 和中介物因子 (mediator) 组成, 箭头表示募集作用 (recruitment).

2 转录激活协同性的三种产生机制

2.1 激活蛋白之间的相互作用

Ouchi 等^[8]发现 IFN- γ 基因转录时, BRCA1 和 STAT1 激活蛋白协同性地结合各自的调控位点的过程, 涉及了 BRCA1 的 502~802 位氨基酸和 STAT1 的 C 端转录激活域之间的相互作用. 另外的实验中, STAT5 蛋白与糖皮质激素受体之间的相互作用, 则是它们协同性地激活 β -casein 基因转录的原因^[9].

Lehman 等^[10]认为激活蛋白结合调控位点、转录机器结合启动子以及激活蛋白结合转录机器的过程都可以降低转录起始体系的自由能, 而自由能的减少有利于转录机器的形成和稳定. 从这个角度理

解, 与单个激活蛋白的作用相比, 多激活蛋白之间的相互作用产生了额外的自由能降低, 使多个调控蛋白同时作用的效果大于每个蛋白质单独作用之和.

2.2 激活蛋白与多个 DNA 位点的协同性结合

原核体系中 λ 阻遏蛋白协同性地结合 O_{R1} 、 O_{R2} 、 O_{R3} 三个位点, 从而调控 *cro* 基因的转录^[11], 这一过程已为人们熟知, 真核体系中这种机制同样存在. Vashee 等^[12]证明激活蛋白之间没有特异性的相互作用时, 也可以协同地结合 DNA, 这可能是因为 DNA 与激活蛋白的结合促进了核小体结构解体, 从而使 DNA 的构象发生了有利于其他激活蛋白结合的变化. Olivier 等^[13]发现乳头瘤病毒的 E2 激活蛋白与调控位点结合时染色质结构的确发生了显著的变化.

2.3 激活蛋白与转录机器的协同性结合

Carey 等^[6]发现 ZEBRA 与多个 DNA 位点的结合没有协同性, 但转录结果仍然表现出协同现象, 这说明协同性还有其他的产生机制. 激活蛋白与转录复合物的协同作用可能与氧分子协同结合血红蛋白类似, 即第一个激活蛋白与转录机器结合后使后者的构象发生变化, 有利于第二个激活蛋白的结合. Chi 等^[14]发现转录体系加入 ZEBRA 后 TF II A-TF II D-TATA 复合物与 DNA 的结合情况发生了明显的变化, 这预示了转录机器的构象可能发生了变化. Wang 等^[3]证明这种情况下, 在 EBV 体外转录体系中如果多个 ZEBRA 与转录机器的结合没有协同性, 则基因的转录曲线不具有协同性特征.

实际情况是这三种机制可能同时起作用并且是彼此联系的, 例如已经结合在 DNA 位点上的第一个激活蛋白可以通过与第二个激活蛋白发生蛋白质相互作用, 而稳定后者与 DNA 或转录机器的结合, 从而表现为多个激活蛋白协同性地结合 DNA 或转录机器. 总的协同效应应为所有协同机制的叠加.

3 协同性的本质

以上所述三种机制都涉及了结合在多个调控位点上的激活蛋白之间直接或间接的相互作用 (图 3). 以往的观点认为热力学关系 $K = e^{-\Delta G/RT}$ (K 为亲和常数, ΔG 为结合自由能, R 、 T 分别代表理想气体常数和绝对温度) 中 K 与 ΔG 的指数关系导致了非线性的转录现象^[2], 但这无法解释为什么单个位点的转录曲线是线性的 (图 1), 而只

有存在多个位点的情况下才表现出 S 形的转录曲线。

单个调控位点的线性曲线表明独立的位点在系统中可比作线性元件, 如果在系统中加入若干个彼此独立的线性元件 (例如在电路中串联几个相同的电阻), 总的效应是线性迭加的。只有当这些元件之间相互影响 (例如一个元件可以通过量子效应改变另一个元件的行为), 才会出现由线性曲线到非线性曲线的变化。因此多个激活蛋白之间直接或间接的相互作用可能是协同激活的本质。

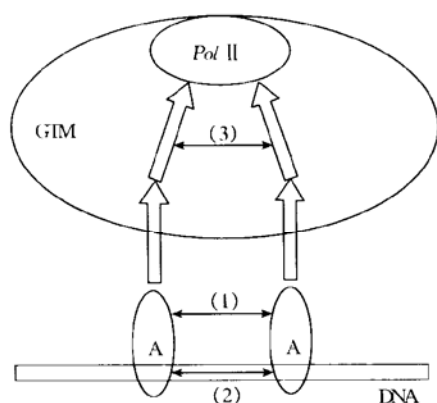


Fig. 3 Transcriptional synergy is caused by direct or indirect interactions among activators bound to multiple regulatory sites upstream of a gene

图 3 转录协同性的本质是结合在 DNA 调控位点上的多个激活蛋白之间直接或间接的相互作用

这些相互作用包括: 蛋白质相互结合的直接相互作用 (1), 激活蛋白改变 DNA 构象 (2) 或改变转录机器构象的间接相互作用 (3)。空心箭头表示募集作用, 实心箭头为激活蛋白之间的相互作用。

4 结语和展望

基因转录过程中, 激活蛋白与 DNA 多调控位点的作用已有大量研究工作, 结果表明激活蛋白与基因上游调控位点的结合是转录起始的关键步骤, 但对激活蛋白与转录机器作用的细节尚不了解。最近在酵母和高等动物的全酶 (holoenzyme) 中都分离到了多种中介物因子 (mediator)^[15], 一般认为它们与激活蛋白激活区域直接作用, 从而传递激活蛋白对聚合酶 II 的募集作用。研究激活蛋白与中介物因子的相互作用^[16]以及中介物因子的结构、组织特异性和同源性为分析激活蛋白与转录机器的作用机制提供了手段, 成为当前基因转录机理研究的

热点之一。

基因芯片和计算机搜索的方法都表明真核生物的一种激活蛋白往往调控着功能相关的一组基因的转录^[17], 例如在酵母基因组中 10 个受 GAL4 调控的基因都参与了半乳糖代谢。一种激活蛋白调控多个基因的启动子亲和力、结合位点数量、结合位点亲和力的不同, 直接导致了不同的基因只有在特定的条件下 (如一定的激活蛋白浓度) 才开启转录开关, 且转录合成 mRNA 的量随条件不同而存在差异。如果能够建立上述变量与转录水平的定量或半定量关系, 就有可能通过分析基因上游调控位点的特征来判断某个基因转录的最适条件以及比较多个基因转录时序的先后和转录水平^[3], 这也是在全基因组内寻找功能相关基因的潜在方法。

目前的体外实验研究大多仅限于一种激活蛋白对转录的调控作用, 体内的情况要复杂得多, 例如人类 INF- β 基因具有 NF- κ B、ATF-2/C-Jun 和 IRF-1 等多种激活蛋白的结合位点^[18]。研究不同激活蛋白的协同作用将使我们的工作更接近基因转录的真实情况, 而利用基因芯片技术和生物信息学方法, 研究激活蛋白对多个基因的协同调控方法, 则将为绘制基因调控网络奠定基础^[19]。

参 考 文 献

- 1 Ptashne M, Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 1997, **386** (6625): 569~ 577
- 2 Carey M. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*, 1998, **92** (1): 5~ 8
- 3 Wang J, Ellwood K, Lehman A M, *et al.* A mathematical model for synergistic eukaryotic gene activation. *J Mol Biol*, 1999, **286** (2): 315~ 325
- 4 Ellwood K, Huang W, Johnson R, *et al.* Multiple layers of cooperativity regulate enhanceosome responsive RNA polymerase II transcription complex assembly. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (4): 2613~ 2623
- 5 Carey M, Lin Y S, Green M R, *et al.* A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature*, 1990, **345** (6273): 361~ 364
- 6 Carey M, Kolman J, Katz D A, *et al.* Transcriptional synergy by the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA. *J Virol*, 1992, **66** (8): 4803~ 4813
- 7 Kakidani H, Ptashne M. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*, 1988, **52** (2): 161~ 167
- 8 Ouchi T, Lee S W, Ouchi M, *et al.* Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (10): 5208~ 5213
- 9 Wyszomierski S L, Yeh J, Rosen J M. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Molecular Endocrinology*, 1999, **13** (2): 330~ 343

- 10 Lehman A M, Ellwood K B, Carey M, *et al.* Compensatory energetic relationships between upstream activators and the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *J Biol Chem*, 1998, **273** (2): 932~ 939
- 11 Ackers G K, Johnson A D, Shea M A. Quantitative model for gene regulation by lambda phage repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79** (4): 1129~ 1133
- 12 Vashee S, Melcher K, Ding W V, *et al.* Evidence for two modes of cooperative DNA binding *in vivo* that do not involve direct protein-protein interactions. *Current Biol*, 1998, **8** (8): 452~ 458
- 13 Olivier L, Steger G, Yaniv M. Synergistic transcriptional activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA Binding and correlates with a change in chromatin structure. *J Mol Biol*, 1997, **266** (3): 465~ 478
- 14 Chi T, Carey M. Assembly of the isomerized TF II A-TF II D-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation. *Genes & Dev*, 1996, **10** (20): 2540~ 2550
- 15 Malik S, Roeder R G. Transcriptional regulation through mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biol Sci*, 2000, **25** (6): 277~ 283
- 16 Park J M, Werner J, Kim J M, *et al.* Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol Cell*, 2001, **8** (1): 9~ 19
- 17 Ren B, Robert F, Wyrick J J, *et al.* Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 2000, **290** (5500): 2306~ 2309
- 18 Kim T K, Maniatis T. The mechanism of transcriptional synergy of an *in vitro* assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell*, 1997, **1** (1): 119~ 129
- 19 Pilpel Y, Sudarsanam P, Church G M. Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. *Nature Genet*, 2001, **29** (2): 153~ 159

Synergistic Activation of Eukaryotic Gene Transcription by Multiple Upstream Sites*

XUE Wen, WANG Jin**, HUANG Qi-Lai, ZHENG Wei-Juan, HUA Zi-Chun

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Sigmoid curve and non-additive activation by multiple regulatory sites are two typical manifestations of transcriptional synergy in eukaryotes. There are three possible mechanisms for synergistic regulation: interaction between activators, cooperative binding of activators to DNA upstream sites and cooperative interaction of site-bound activators with GTM (general transcriptional machinery) components. All these mechanisms involve direct or indirect interactions among multiple activators that bind to upstream regulatory sites. The pre-bound activators can facilitate the binding of free ones through these interactions and this underlines the basis of synergistic activation.

Key words transcription, transcriptional activation, gene regulation, synergy

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39970184, 79970116).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3592332, E-mail: jwang@nju.edu.cn

Received: December 30, 2001 Accepted: February 8, 2002